

U.S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY  
INFORMATION REPORT

25X1A

COUNTRY USSR

SUBJECT Comments on the work of AA Smorodintsev and O I Shishkina  
Dept. of Viruses, Union Institute of Exp. Medicine, MoscowPLACE ACQUIRED  
(BY SOURCE)

25X1A

DATE ACQUIRED  
(BY SOURCE)

DATE (OF INFO

DATE DISTR. 25 Sep 52

NO. OF PAGES 2

NO. OF ENCLS.

SUPP. TO  
REPORT NO.

25X1X

THIS DOCUMENT CONTAINS INFORMATION AFFECTING THE NATIONAL DEFENSE OF THE UNITED STATES, WITHIN THE MEANING OF TITLE 18, SECTIONS 793 AND 794, OF THE U.S. CODE, AS AMENDED. ITS TRANSMISSION OR REVELATION OF ITS CONTENTS TO OR RECEIPT BY AN UNAUTHORIZED PERSON IS PROHIBITED BY LAW. THE REPRODUCTION OF THIS REPORT IS PROHIBITED.

THIS IS UNEVALUATED INFORMATION

SOURCE

1.

"The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum" by A A Smorodintsev and O I Shishkina, Department of Viruses, Union Institute of Experimental Medicine, Moscow. The summary translation of the article states:

"Reactivation of gripe virus from neutral and hyper-neutral mixtures can be accomplished by various methods of isolating the virus from the antibody.

"By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can be isolated only from mixtures which are balanced as far as possible and which contain only a small excess of antibodies.

"A simple method of isolating influenza virus from hyperneutral mixtures is the treatment of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the antibodies have been removed by washing.

"The most exact results, based not only on the isolation, but also on the quantitative characterization of the virus isolated from neutral mixtures, are afforded by the method of adsorption and elution of the virus on the surface of Elford membrane filters and by repeated washing out of the neutral mixtures in ultra-centrifuges.

"The quantitative extent of the reactivation of influenza virus from neutral mixtures with specific serums are not decreased in conditions which increase the intensity of the interaction between virus and antibodies. While removing the virus from the antibodies by washing on Elford filters and in the ultra-centrifuge, the authors observed a high degree of reactivation even after increasing the concentration of antibodies, increasing the temperatures, and lengthening the time of contact."

U.S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

DISTRIBUTION →	STATE	<input checked="" type="checkbox"/> ARMY	<input checked="" type="checkbox"/> NAVY	<input checked="" type="checkbox"/> AIR	<input checked="" type="checkbox"/> FBI	<input checked="" type="checkbox"/> B/SI	<input checked="" type="checkbox"/> EV		
----------------	-------	--	--	---	---	--	--	--	--

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

25X1X

- 2 -

25X1A

2. [REDACTED] the following references are given in the articles:

- a) A A SMORODINTSEV and O I SHISHKINA. The role of the humoral factor in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:3, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- b) A A SMORODINSEV and O I SHISHKINA. The role of phagocytic apparatus in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:20, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- c) TODD C. Brit. J. exper. Pathol., 9, 244, 1928.
- d) BEDSON S.P. Ibid., 9, 235, 1928; 10, 671, 1928.
- e) ANDREWES C H, J. Path. a. Bacter., 31, 671, 1928.
- f) LONG P H. a. P.K. OLITSKY. J. of exper. Med., 51, 209, 1930.
- g) CRAIGIE J. Handb. d. Virusforschung, Bd. 2, 1106, 1939.
- h) McKINNON N E. J. prevent. Med., 4, 411, 1930.
- i) SABIN A B. Brit. J. exper. Path., 16, 70, 1935; 16, 84, 1935.
- j) MAGRASSI a. HALLAUER, J. Bacteriol., 17, 6, 1936.
- k) MAGILL T P a. FRANCIS T. JR. J. exp. Med., 65, 861, 1937.
- l) BURNET F M, E V KEOGH a. D LUSH. Australian J. exp. Biol., 15, 320, 1937.
- m) TAYLOR R M, J. of Immunol., 40, 373, 1941.
- n) REED L J a. H MUENCH. Am. J. Hyg., 27, 493, 1938.

25X1X

3. [REDACTED] the only thing contained in the foregoing summary which is not of general knowledge is the use of animal charcoal as an adsorbent to isolate the virus from hyperneutral mixtures as a successful method of transmitting infection to mice. The idea itself is not new as various ion exchange resins have been used for the isolation of a specific virus. Also, the use of adsorbent columns, such as aluminum hydroxide gel, are capable of taking some viruses from neutral or hyperneutral mixtures. [REDACTED] animal charcoal has not been used in the US for the purpose described. [REDACTED] nothing of particular value in the way of a new contribution to our present knowledge of biological antagonists.

25X1X

25X1X

[On file in FDD is a copy of the original Soviet article entitled "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum."]

- end -

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

U.S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY

## INFORMATION REPORT

25X1A

COUNTRY USSR

SUBJECT Comments on the work of AA Smorodintsev and O I Shishkina  
Dept. of Viruses, Union Institute of Exp. Medicine, MoscowPLACE ACQUIRED  
(BY SOURCE)

25X1A

DATE ACQUIRED  
(BY SOURCE)

DATE (OF INFO)

DATE DISTR. 25 SEP 52

NO. OF PAGES 2

NO. OF ENCLS.

SUPP. TO  
REPORT NO.

25X1X

THIS DOCUMENT CONTAINS INFORMATION AFFECTING THE NATIONAL DEFENSE OF THE UNITED STATES, WITHIN THE MEANING OF TITLE 18, SECTIONS 793 AND 794, OF THE U.S. CODE, AS AMENDED. ITS TRANSMISSION OR REVELATION OF ITS CONTENTS TO OR RECEIPT BY AN UNAUTHORIZED PERSON IS PROHIBITED BY LAW. THE REPRODUCTION OF THIS REPORT IS PROHIBITED.

THIS IS UNEVALUATED INFORMATION

SOURCE

1. [REDACTED] dated 1945 and entitled "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum" by A A Smorodintsev and O I Shishkina, Department of Viruses, Union Institute of Experimental Medicine, Moscow. The summary translation of the article states:

"Reactivation of grippé virus from neutral and hyper-neutral mixtures can be accomplished by various methods of isolating the virus from the antibody.

"By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can be isolated only from mixtures which are balanced as far as possible and which contain only a small excess of antibodies.

"A simple method of isolating influenza virus from hyperneutral mixtures is the treatment of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the antibodies have been removed by washing.

"The most exact results, based not only on the isolation, but also on the quantitative characterization of the virus isolated from neutral mixtures, are afforded by the method of adsorption and elution of the virus on the surface of Elford membrane filters and by repeated washing out of the neutral mixtures in ultra-centrifuges.

"The quantitative extent of the reactivation of influenza virus from neutral mixtures with specific serums are not decreased in conditions which increase the intensity of the interaction between virus and antibodies. While removing the virus from the antibodies by washing on Elford filters and in the ultra-centrifuge, the authors observed a high degree of reactivation even after increasing the concentration of antibodies, increasing the temperatures, and lengthening the time of contact."

THIS DOCUMENT HAS AN ENCLOSURE ATTACHED -  
DO NOT DETACH

U.S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

DISTRIBUTION	STATE	<input checked="" type="checkbox"/> ARMY	<input checked="" type="checkbox"/> NAVY	<input checked="" type="checkbox"/> AIR	<input checked="" type="checkbox"/> FBI	<input checked="" type="checkbox"/> B/SI	<input checked="" type="checkbox"/> EV		
--------------	-------	--	--	---	---	--	--	--	--

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

25X1X

- 2 -

25X1A

2. [REDACTED] the following references are given in the articles:

- a) A A SMORODINTSEV and O I SHISHKINA. The role of the humoral factor in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:3, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- b) A A SMORODINSEV and O I SHISHKINA. The role of phagocytic apparatus in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:20, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- c) TODD C. Brit. J. exper. Pathol., 9, 244, 1928.
- d) BEDSON S.P. Ibid., 9, 235, 1928; 10, 671, 1928.
- e) ANDREWES C H, J. Path. a. Bacter., 31, 671, 1928.
- f) LONG P H. a. P.K. OLITSKY. J. of exper. Med., 51, 209, 1930.
- g) CRAIGIE J. Handb. d. Virusforschung, Bd. 2, 1106, 1939.
- h) McKINNON N E. J. prevent. Med., 4, 411, 1930.
- i) SABIN A B. Brit. J. exper. Path., 16, 70, 1935; 16, 84, 1935.
- j) MAGRASSI a. HALLAUER, J. Bacteriol., 17, 6, 1936.
- k) MAGILL T P a. FRANCIS T. JR. J. exp. Med., 65, 861, 1937.
- l) BURNET F M, E V KEOGH a. D LUSH. Australian J. exp. Biol., 15, 320, 1937.
- m) TAYLOR R M, J. of Immunol., 40, 373, 1941.
- n) REED L J a. H MUENCH. Am. J. Hyg., 27, 493, 1938.

25X1X

3. [REDACTED] the only thing contained in the foregoing summary which is not of general knowledge is the use of animal charcoal as an adsorbent to isolate the virus from hyperneutral mixtures as a successful method of transmitting infection to mice. The idea itself is not new as various ion exchange resins have been used for the isolation of a specific virus. Also, the use of adsorbent columns, such as aluminum hydroxide gel, are capable of taking some viruses from neutral or hyperneutral mixtures. [REDACTED] animal charcoal has not been used in the US for the purpose described. [REDACTED] nothing of particular value in the way of a new contribution to our present knowledge of biological antagonists.

25X1X

25X1X

[On file in FDD is a copy of the original Soviet article entitled "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum."]

- end -

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

## Influenza

The Possibility of Reactivating ~~Grippe~~ Virus From A Mixture With Immune Serum

A.A. Smorodintsev and O.I. Shishkina  
 Dep't of Viruses, ~~Inst of~~ Inst of  
 Exper Medicine, ~~Inst of~~

Reactivation of gripe virus from ~~mix~~ neutral and ~~gripe~~ neutral mixtures can be accomplished by various methods of ~~separating~~ <sup>isolating</sup> the virus from the antibody.

By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can be <sup>isolated</sup> freed only from ~~mix~~ mixtures which are <sup>as</sup> balanced as <sup>far as</sup> possible and which contain only a small excess of antibodies.

A <sup>isolating</sup> simplest method of ~~separating~~ influenza virus from hyperneutral mixtures is the treatment ~~breakdown~~ of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent ~~intranasal~~ intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the antibodies have been removed by washing.

The most exact results, based not only on the isolation, but also on the quantitative characteristics of the virus isolated from neutral mixtures, are afforded by the method of adsorption and elution of the virus on the surface of Elford membrane filters, and by repeated washing out of the neutral mixture <sup>intra-</sup> in super-centrifuges.

The quantitative <sup>extent</sup> aspects of the reactivation of influenza virus from neutral mixtures with specific serums are not decreased in conditions which increase the intensity of the interaction between virus and antibodies. While removing the virus from the antibodies by washing on Elford filters and in the <sup>intra-</sup> super-centrifuge, the authors observed a high degree of reactivation <sup>even</sup> after increasing the concentration of antibodies, increasing the temperature, and lengthening the time of contact.

SECRET

75

*BEST COPY*  
*Available*

тител. На этом основании *Sabin* сделал заключение об отсутствии прямого взаимодействия между антителами и вирусом и построил парадоксальную теорию о том, что механизм защитного действия антител основан на прямом блокировании чувствительных клеток. *Magrath* и *Hallauer*<sup>10)</sup>, а также *Craigie*<sup>11)</sup>, применяя ту же методику повторного отмыwania осадка нейтральных смесей вируса герпеса в суперцентрифуге, наблюдали уменьшение количества вируса на 90-98%.

Вопрос об обратимости связи между вирусом гриппа и нейтрализующими антителами затронут в работе *Magill* и *Francis*<sup>12)</sup>. Путем повторного отмыwania нейтральных смесей в суперцентрифуге авторы установили полную инактивацию вируса после 35-минутного контакта с антителами при температуре 37°C. *Burnet*, *Keogh* и *Lush*<sup>13)</sup> учитывали активность вируса по количеству пятен на корисаллантовой оболочке и нашли, что в ранних стадиях взаимодействия вируса с антителами процесс полностью обратим, в поздних же стадиях необратим. *Taylor*<sup>14)</sup> показал частичную обратимость вируса гриппа из нейтральных смесей методом последовательных разведений.

При изучении судьбы гриппозного вируса после контакта с гипериммунной сывороткой необходимо выбрать, прежде всего, из большого числа применявшихся методов наиболее чувствительные приемы разделения вируса от антител, обеспечивающие не только качественное обнаружение вируса, но и определение его количества.

#### М а т е р и а л и м е т о д и к а .

Наши исследования проводились со штаммом гриппозного вируса "Ленинград", выделенным в 1936г. и достигшим после многочисленных пассажей на мышах высокой вирулентности. Смертельная доза при интраназальном введении соответствовала по 50% пункту латальности по *Reed и Muench*<sup>15)</sup> 0,0001 см<sup>3</sup> разведения 1/6300.000 - 1/20.000.000. Минимальная индексирующая доза вируса, при которой наблюдается размножение возбудителя в легких, но отсутствует гибель мышей, составила примерно 1/1000 смертельной дозы. Это гарантировало возможность обнаружения методом последовательных пассажей ничтожных количеств вируса, если-б они сохранили активность после взаимодействия с антителами.

- 3 -

Большая часть опытов проведена с противогриппозной лошадиной сывороткой серии "У", полученной путем гипериммунизации логочным мышинным вирусом. На табл. I дано титрование различных разведений этой сыворотки с 3 дозами гриппозного вируса. Нейтрализация нашего вируса требовалась, примерно, эквивалентных разведений сыворотки.

При совпадении /в абсолютном выражении/ разведений сыворотки и вируса смеси их были гипонейтральными. Из таких смесей удалось выделить интактный вирус, путем пассажей, не прибегая к какому либо специальному приему разделения вируса от антител.

Табл. I.

Разведе- ние ле- гочной эмульсии вируса.	Количе- ство <i>20 мл</i>  <i>/ по 50,347 мг/мл</i>	Разведения сыворотки									Разве- дение сыво- ротки, с пол- ной ней- трали- зацией	
		1:10	20	50	100	200	400	800	1600	3200		6400
1:2000	5.560			0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	1:800
1:200	55.600			0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	1:200
1:20	555.000		0/4	0/4	0/3	3/4	4/4	4/4	4/4			1:20

Если сыворотка бралась в 5-10-кратной концентрации по сравнению с разведением вируса, то смесь была полностью нейтрализована и последовательные пассажы легких первично зараженных мышей не давали накопления в легких вируса и гибели животных. Гипернейтральной смесью мы называли такое сочетание вируса и антител, при котором избыток антител был в 100 и более раз выше, чем в нейтральной смеси. Для приготовления гипернейтральных смесей 0,1 см<sup>3</sup> вируса в разведении легочной эмульсии 1:5 добавлялся к 5,5 см<sup>3</sup> неразведенной сыворотки. Окончательное разведение вируса в этих условиях соответствует 1:500.

Сравнительная оценка эффективности различных методов разделения вируса от антител ..

#### 1. Метод разведения нейтральных смесей.

Approved For Release 2001/11/21 : CIA-RDP80-00926A005200020026-6

Серия нейтральных и гипонейтральных смесей дополнительно разво-



- 4 -

лиась дисмембранной средой с соотношением 1:5. Полученные разведения вводились интраназально 4 белым мышам, за которыми устанавливалось наблюдение в течение 10 дней. Респицированные мыши убивались и легкие их повторно вводились свежим мышам /табл.2/.

Табл.2.

Что исследуется.	Вирус 1:100+ сыворотки в разведениях						
	1:20	1:50	1:75	1:100	1:150	1:300	1:600
Исходные смеси вируса и сыворотки	0/6	0/6	0/5	0/6	0/6	2/5	6/6
Пассажи легких перенесших мышей	0/4	0/4	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4
Дополнительные разведения 1:5	0/4	0/4	0/4	4/4	1/4	4/4	4/4
" 1:25	0/4	0/4	0/4	4/4	3/3	4/4	4/4
" 1:125	0/4	0/4	2/4	3/3	3/4	1/4	3/4
" 1:625	0/4	0/4	4/4	4/4	3/4	1/4	-

Обозначения: 2/4 - при непосредств. заражении погибло 2 из 4 мышей в течение 10 дней.

4/4 - на 4 пассажа погибло 4 мыши по 4.

По нашим данным, при помощи метода разведений удастся открыть активный вирус лишь в нейтральных смесях с ничтожным избытком антител. В силу своей малой чувствительности метод разведений непригоден как для открытия активного вируса в нейтральных и особенно в гипернейтральных смесях, так и для количественного учета активного вируса в нейтральных смесях.

## 2. Метод Электрофореза.

Мы пользовались аппаратом Лисина емкостью  $734\text{см}^3$ , с ламповым выпрямителем. Применялись неполяризуемые электроды системы  $\text{Ag-NaCl}$  и  $\text{Cu-CuCl}_2$ . Регулировка pH производилась фосфатными буферами 1/300 - 1/75 моль. Напряжение в сети поддерживалось в пределах 200-280 вольт, а сила тока от 1 до 5,5 мА. Для титрования на присутствие вируса бралась проба шидкости с анода после катоды.

Исследования В.И.Тюгарницкого и О.И.Шимкиной показали, что фи-

- 5 -

рус гриппа несет отрицательный заряд по всей зоне своей стабильности /рН=5,2 - 7,8/ и что очистка его от толстых белков возможна, если ввести электрофорез при рН = 6,0. Наши опыты проводились с различно сбалансированными смесями вируса с антителами.

Как это видно из табл.3, путем электрофореза не удалось активировать вирус и отделить его на аноде из биологически нейтральных смесей, в которых имелся несомненно небольшой избыток вируса, требующих антител. При более значительной степени нейтрализации, катодорез был неспособен реактивировать вирус.

Как показали исследования контрольных смесей вируса с нормальной ледяной сывороткой, подвергнутой 4-часовому электрофорезу, концентрация вируса на аноде выражается скромными показателями, отличаясь от количества вируса на катоде в 5-10 раз. Условно эти мы объясняем неудачи обнаружения активного вируса в нейтральных смесях с большим избытком антител, которые легко балансируют созданный катодорезом скромный прирост вируса на аноде.

3. Адсорбция на каолин и активный уголь. Реактивация вируса гриппа из биологически нейтральных смесей с помощью избирательной адсорбции на каолин и активный уголь осуществлялась добавлением 5% суспензии обоих адсорбентов в солевой раствор с равным объемом нейтральной смеси, тщательным перемешиванием в течение 10 минут и центрифугированием для осаждения взвешенных веществ. Осадок промывали дважды в центрифуге 100 см<sup>3</sup> солевого раствора, после чего дисперсировали в 100 см<sup>3</sup> раствором аликвота для электрофореза вируса с поверхности адсорбентов. После центрифугирования остаток жидкой фазы выливали, а также осадок вводились интраназально мышам. /табл.3 и 4/

Адсорбцией на каолин нам удалось обнаружить в мышах активный вирус, если нейтральная смесь имела небольшой избыток антител. В равных условиях элюаты жидкого угля были неактивны. Напротив, остаточные осадки обоих адсорбентов, введенные непосредственно в дыхательные пути мышей, обладали значительной активностью.

Что исследуется.		1:10	1:25	1:50	1:75	1:100	1:250
Исходные слюси вируса и сыворотки		0/5	0/4	0/6	1/6	1/5	3/4
После легких порезивших мышей		0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	
После катодореза	анод	0/6	2/5	2/4	4/4	5/5	4/4
	катод	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	1/5

Методы реагирования	Вирус 1 : 500 + разведений <i>сыворотки</i>	1:10	1:25	1:50	1:100	1:200
Исходная смесь	0/6	0/6	0/4	0/6	3/8	4/8
Катафореза	0/6	0/6	0/6	6/6	2/5	6/6
Дополнительные разведения 1:4-1:256	0/4	0/4	4/6	6/6	3/6	4/4
<i>элюат после адсорбции на углем</i> Адсорбция на углем	0/4	2/4	3/3	4/4	4/4	3/3
<i>осадок после адсорбции на углем</i> Адсорбция на углем	0/6	5/5	4/4	5/5	6/6	5/5
<i>элюат после адсорбции на углем</i> Адсорбция на углем	0/4	0/4	0/5	4/4	4/4	3/3
<i>осадок после адсорбции на углем</i> Адсорбция на углем	5/5	5/5	4/4	4/4	5/5	5/5

Особенно ценным приемом реактивации являлся пропуск из нейтральных сред через адсорбция на широтный уголь. По разработанному нами методу необходимо зарезать мышей резексией частиц гидрофобного угля, ~~которое состоит из~~ стеклянной воронки (на жесткой подставке) от избытка антигенов бульоном или раствором Гиллера.

Approved For Release 2001/11/21 : CIA-RDP80-00926A005200020026-6

- 7 -

титровать не более 1/200 - 1/1000 исходной массы вируса даже из смеси вируса с нормальной сывороткой. При малом содержании вируса в смеси метод адсорбции на уголь дает отрицательные результаты, что объясняется, по-видимому, неполной адсорбцией вируса на исходной смеси, а также слабой адсорбцией вируса глины с частью известного угля на эритроцитарные клетки. /Табл.5/.

Табл.5.

Что обследуется.	Четочная эмульсия вируса титруется в диазедентах.					
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Смесь с нормальной сывороткой /1:5/			4/4	4/4	4/5	2/5
Смесь с иммун.сывороткой /1:5/	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/3
Экстракт сыворотного угля из нейтральной смеси	0/4	0/4	0/4		0/4	
Отмытый осадок сыворотного угля из нейтральной смеси	1/4	1/4	0/3	0/4	0/4	0/4
Отмытый осадок сыворотного угля из смеси с нормальной сывороткой.	3/4	4/4	1/3	0/4	0/4	0/4

По наблюдениям нашей лаборатории /О.С.Бак/ метод адсорбции на уголь особенно нежен для реактивации из нейтральных смесей гальмашевиц вирус, например, известного сыв. адгата, если эти смеси содержат большое количество испытуемого вируса.

#### 4. Реактивация вируса глины из нейтральных смесей сывороткой ~~отмытым~~ на фильтрах Эльборга и в центрифуге.

Мы пользовались мембранными фильтрами различной пористости, приготовленными в лаборатории проф. Г.И.Тогарникова по методу Эльборга. Первые опыты были поставлены со смесями вируса глины с нормальной лошадиной сывороткой. Мембраны с диаметром пор более 200 мк оказались непроницаемыми, так как пропускали значительную часть вируса в фильтрат и давали поэтому слабоактивный элюат. При диаметре пор между 100-200 мк активность фильтрата резко понижалась, а содержание вируса в элюатах достигало наибольших цифр. Большая часть опытов проведена с фильтрами

- 8 -

с диаметром пор в 125-175  $\mu$ , стартовавших в аппараты Зейтца. Эти фильтры задерживали значительную часть вируса и позволяли проводить фильтрацию достаточно быстро.

Для удаления сыворотки через фильтр пропусклся 3-6 раз раствор Рингера или разведенный 1:5 бульон /5см<sup>3</sup> на каждое промывание/, после чего фильтр вынимался из аппарата Зейтца, тщательно растирался с кварцевым песком в ступке с 3см<sup>3</sup> 10/300 раствора аммиака, для ослабления связей между веществом фильтра и вирусом.

После легкого центрифугирования эликат освобождался от вещества фильтра и обследовался титрованием на мышах.

Другим приемом механического разделения вируса гриппа от антител служило в наших опытах суперцентрифугирование в горизонтальной центрифуге Эппендорфа при 13.000 оборотах в минуту. После 4-часового центрифугирования вышестоящая жидкость удалялась и к осадку добавлялось 20см<sup>3</sup> фосфатбукерного раствора. Для наибольшего освобождения от посторонних веществ эта процедура повторялась 3 раза. Отмытый осадок доводился до 3см<sup>3</sup> и титровался на мышах.

В предварительных опытах был изучен предел выявляемости вируса гриппа из смесей с нормальной лошадиной сывороткой, при помощи электролиза с фильтров Эльфорта и суперцентрифугирования. Нормальная лошадиная сыворотка в разведении 1:5 смешивалась с равными объемами вируса 1:20, 1:2000, 1:200.000/ /табл. 6/.

Количество смертельных мышинных доз в исходном вирусе составляло  $8 \cdot 10^6$ . Титр того же вируса после фильтрования через мембранные фильтры, промывания от сыворотки и электролиза упал до  $2.75 \cdot 10^5$ , после отмывания осадка в суперцентрифуге до  $1.13 \cdot 10^6$ .

Таким образом, работая со смесью вируса с нормальной сывороткой удалось сохранить после промывания на поверхности мембранных фильтров около 5% исходной массы вируса, в осадках после отмывания в суперцентрифуге до 20% исходного вируса. Эти методы оказались весьма ценными для разделения вируса от антител в нейтральных смесях.

Легочная эмульсия вируса в разведении 1:500 приносила в продол-

- 9 -

Табл. 6.

Чувствительность методов эликирования с мембранных фильтров и суперцентрифугирования / вирус в смеси с нормальной сывороткой/.

50%  $\dagger$  исходного вируса = 1:8.000.000

Количество в смеси с нормальной сывороткой.	Конечное разведение эликатор или осадков									
	Эликаты					Осадки в суперцентрифуге				
	1:40 тыс.	1:200 тыс.	1:1 милл.	1:5 милл.	50% $\dagger$	1:40 т.	1:200 т.	1:1 милл.	1:5 милл.	50% $\dagger$
400.000	3/4	4/5	1/5	0/5	370 тыс.	4/4	5/5	3/5	1/5	1 милл.
4.000	4/4	2/5	0/5	0/5	155 тыс.	4/4	4/4	1/4	0/5	590 тыс.
40		2/5	1/5	0/5	200 тыс.		4/5	4/5	1/5	1 милл. 800 тыс.
Средний по- казатель для 50% $\dagger$					275 тыс.					1 милл. 130 тыс.

интенсивный контакт с лошадиной иммунсывороткой в разведении 1:2, 1:20 и 1:400. Контролем служила смесь той же дозы вируса с нормальной лошадиной сывороткой 1:2, которая подверглась одномоментному изучению методом разделения на фильтрах и в суперцентрифуге. Нейтральные и контрольные смеси фильтровались через мембраны Эльфорда в 175 миллимикрон и освобождались от сыворотки 6-кратным отмыванием фосфатнобуферным раствором /общий об'ем промывной жидкости 30-60 см<sup>3</sup>/.

Прогерочные опыты показали, что столь интенсивное промывание фильтров хорошо удаляет антитела и резко снижает вируснейтрализующие свойства эликатор. Если ограничиться 2-4 кратной промывкой фильтра /по 5 см<sup>3</sup> буферного раствора на каждое промывание/, то эликаты /после 30 мин. прогрева при 56°C для освобождения от вируса/ способны нейтрализовать небольшие дозы вируса, чем резко нарушается точность исследования. Разделение вируса от антител в суперцентрифуге достигалось трехкратным промыванием осадка вируса фосфатно-буферным раствором /по 20 см<sup>3</sup> на каждое промывание/.

- 10 -

Как это видно из табл.6, методы отмыывания нейтральной смеси на пористости мембранных фильтров Эльфорта или - суперцентрифуге оказались наиболее чувствительными приемами разделения вируса от антител и обнаружения активного вируса в гипернейтральной смеси. Особенной ценностью этих методов реактивации является возможность точного количественного учета вируса, сохранившего свою активность после контакта с антителами.

Метод суперцентрифугирования оказался более точным, но и более громоздким приемом, чем отмыывание на фильтрах Эльфорта. Последний и был широко использован нами для анализа различных сторон реактивации нейтральной смеси.

Табл.7.

Метод реактивации	Угнетение вируса I:50 + $\alpha$ I:2					Normal serum I:50 + $\alpha$ I:2				
	Дополнительные разведения									
	Не-раз-вед.	I:20	I:400	I:8 тыс.	I:160 тыс.	Не-раз-вед.	I:20	I:400	I:8 тыс.	I:160 тыс.
Суперцентрифугирование	4/4	4/4	3/4	2/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4
Одмывание с фильтров Эльфорта	4/4	4/4	3/4	0/4	0/4	4/4	3/3	4/4	2/4	0/4
Исх. смеси	0/4	0/4	0/4					4/4	4/5	4/5

##### 5. Влияние концентрации иммунсывороток на активность гриппозного вируса.

Вирус гриппа /эмульсия легких белых мышей в разведении 1:500/ соединялся с различными концентрациями лошадиной иммунсыворотки /1:2, 1:40, 1:400/, а также с нормальной лошадиной сывороткой 1:2. После 20-часового контакта /2ч. при 37°C и 18 час. при 2°C/ нейтральная смесь отмыывалась на фильтрах Эльфорта /6 раз по 5см<sup>3</sup> жидкости/, а также в суперцентрифуге. Проверка исходных нейтральных смесей заражением мышей и повторными пассажами установила неактивность смесей даже при разведении сыворотки 1:400.

## - II -

Количественное обсеменение элюатов с фильтров Ольборда, а также осадков после суперцентрифугирования показало возможность далеко идущей реактивации вируса из гиперцентрализованных смесей /табл.8/.

Табл.8.

Сыворотка	Разре- дения сыво- ротки	Контроль исходных сме- сей Зара- жение	Контроль исходных сме- сей		Элюаты с фильтров Ольборда в разведениях.						50%+
			1	2	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	
Иммунная	1:2	0/3	0/3	0/3	6/6	6/6	4/6	2/5	0/6		339
"	1:20	0/3	0/3	0/3	6/6	6/6	5/6	1/6	0/3		317
"	1:400	0/3	3/3		6/6	6/6	4/5	3/6	0/5		777
Нормаль- ная.	1:2	0/3			3/5	3/5	4/5	3/6	0/3		2200

Путем отмывания вируса от антител на фильтрах Ольборда в смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой обнаружено 2220 смертельных доз, в смеси с иммунсыворотками 1:400-777, 1:40-317, 1:2-339 смертельных доз /по 50% пункту летальности/ вычисленному по Reed и Muench. Методом отмывания в суперцентрифуге мы имели соответственно 2 2000 *slm* в контроле, 1250, 4 000, 4 800 *slm* в опытных смесях.

Мы обнаружили, таким образом, до 20% исходной массы вируса после суточного контакта его с антителами. При этом оказалось, что различия в концентрации антител не отражаются на количественной стороне реактивации. Путем интенсивного отмывания от антител удалось восстановить значительный % вируса, находившегося в центральной смеси, независимо от титра антител. Повторяя эти опыты, мы наблюдали изредка менее отчетливую реактивацию из гиперцентрализованных смесей, причиной чего было, вероятно, неполное удаление антител с фильтров или из осадка в суперцентрифуге. В этих случаях контроль соответствующих элюатов или отмытого осадка, прогретых 1/2 часа при 56°C /для инактивации вируса/ устанавливал нейтрализующие свойства такого материала.

Если-б нейтрализующие антитела вызвали необратимую инактивацию вируса, этот процесс усиливался бы в своей интенсивности при повышении температуры или увеличении продолжительности.



- 12 -

следования не подтвердили, однако, такого предположения.

0,1 см<sup>3</sup> гриппозного вируса в разведении 1:5 соединялся с 9,9 см<sup>3</sup> неразведенной иммунсыворотки и выдерживался 2 часа при  $t = 0^{\circ}, 21^{\circ}$  и  $37^{\circ}\text{C}$ , после чего отмылся от антител на фильтрах Альфорта пористостью  $\approx 150$  а также в суперцентрифуге. Смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой, выдержанные в тех же условиях, служили контролем /табл. 9/.

Осадки гипернеутральной смеси, а также промытые осадки после суперцентрифугирования обнаружили присутствие активного вируса, количество которого прогрессивно уменьшалось по мере возрастания температуры контакта. Однако, оказалось, что более значительная гибель вируса при  $21^{\circ}$  и  $37^{\circ}\text{C}$  наблюдалась не только в нейтральных смесях, но и после взаимодействия вируса с нормальной сывороткой. За 2 часа экспозиции вируса при этих температурах терялось до 90% исходной активности не только в нейтральных, но и в контрольных смесях. Важно отметить, что в этих температурных условиях нам удавалось реактивировать из нейтральных смесей до 50% вируса по сравнению с контролем, причем повышение температуры до  $37^{\circ}\text{C}$  не вызвало более интенсивной инактивации, чем при температуре  $\approx 2^{\circ}\text{C}$ .

Табл. 9.

Влияние 1 <sup>0</sup> контакта на прочность связи А.											
Темп.	Сыворотка	Осадки в разведениях				Осадки/осады в разведении					
		2500	150	250	2,5	2500	250	250	2,5	30	30
0 <sup>0</sup>	Иммун.	4/6	3/6	4/6	1/3	517000	3/6	3/6	1/3	0/3	137.000
	Норм.	6/6	6/6	4/6	0/6	437000	6/6	6/6	5/6	1/3	1390000
21 <sup>0</sup>	Иммун.	5/6	2/6	0/6	0/3	10.000	6/6	3/6	2/4	0/6	250.000
	Норм.	4/6	6/6	0/6	0/2	53.800	6/6	6/6	3/6	0/3	250.000
37 <sup>0</sup>	Иммун.	4/6	2/6	0/5	0/3	7.770	5/5	2/6	0/5	0/6	10.000
	Норм.	4/6	4/6	0/4	0/3	13.900	6/0	4/6	0/5	0/4	43.700

На таблице № 10 даны результаты двух опытов, выяснивших влияние длительности контакта на судьбу вируса гриппа в гипернеутрализованных смесях. В этих опытах 0,1 см<sup>3</sup> вируса в разведении 1:5 было соединено с 9,9 см<sup>3</sup> неразведенной иммунсыворотки или нормальной лошадиной сыворотки. После контакта, длительность которого колебалась от 15 мин. до 72 час.

- 13 -

/при температуре в 18-20°C/ нейтральные и контрольные смеси реактивировались на фильтрах Блэфорда. Исходные нейтральные смеси не обнаружили присутствия активного вируса при биологическом контроле на мишах с двукратными пассажами. Контрольные смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой содержали 225.000 смертельных доз в 0,05см<sup>3</sup>. И в этих опытах не удалось обнаружить влияния длительности контакта с антителами на степень инактивации вируса гриппа: реактивация вируса из нейтральных смесей осуществлялась одинаково полно как после короткого, так и после длительного взаимодействия. Как и следовало ожидать, вирус

Табл. 10.

Судьба вируса гриппа при взаимодействии с иммунной сывороткой

Сроки кон- такта вируса с сыво- рот- кой	Об- лед- ение	Разведение элюатов, полученных из смеси вируса с сывороткой.									
		I - И О П Ы Т					2 - И О П Ы Т				
		Исх. /:25	/:625	/:15.625	с раз- веде- ния 50%	Исх. /:25	/:625	/:15.625	с раз- веде- ния 50%		
5 мин.	инициал	4/6	4/6	2/6	2/6	121	4/5	4/5	2/6	1/5	180
	нормальная	5/6	3/6	4/6	0/6	130	2/3	1/4	5/6	0/6	1600
30 мин.	инициал	6/6	5/6	3/5	1/5	1090	3/3	3/6	1/5	0/5	42
	нормальная	5/5	5/6	2/6	0/6	192	3/3	5/6	1/6	1/5	123
2 часа	инициал	5/6	3/6	0/6	1/2	25	5/6	2/6	2/6		325
	нормальная	5/6	5/6	0/6	0/5	91	2/5	1/4	5/6		325
4 часа	инициал	6/6	6/6	3/6		625	5/5	2/6	0/6		275
	нормальная	5/6	4/5	4/6	1/5	1350	5/6	3/6	0/5		325
24 час.	инициал	6/6	6/6	1/6		170	4/5	1/6	2/6		9
	нормальная	1/4	1/6	1/6	0/4	625	1/4	2/5	1/6		25
48 час.	инициал	1/5	0/6			1	0/6	1/6	0/6		7
	нормальная	3/6	1/6			1.5	3/3	3/6	0/6		25
72 час.	инициал	0/5				1	0/5	1/6	0/5		1
	нормальная	2/5				1	0/5	2/6	0/6		1
Сред- ние	инициал					388					189
цифры	нормальная					485					453
означения:											

- 14 -

гриппа потерял значительную часть своей активности после продолжительного пребывания в условиях комнатной температуры, причем этот процесс протекал одинаково интенсивно не только в нейтральных, но и в контрольных смесях.

Наши исследования показали возможность далеко идущей реактивации вируса гриппа из нейтральных смесей, количественная сторона которой не зависит от концентрации антител, внешней температуры и продолжительности контакта. Это дает основание отрицать наличие необратимого разрушения /лизиса/ вируса гриппа после длительного взаимодействия с избытком антител.

Как это видно из приведенных таблиц, концентрация реактивированного вируса из нейтральных смесей почти во всех опытах уступает количеству вируса из смесей с нормальными соотношениями. По всем данным причиной тому не является более интенсивная инактивация вируса при контакте с антителами, поскольку <sup>процент</sup> ~~количество~~ инактивированного вируса не возрастает под влиянием повышенных доз антител или увеличения времени и температуры контакта. Более правильно <sup>объяснить</sup> полученное расхождение ~~и~~ недостаточным совершенством применявшихся методов удаления антител, адсорбированных вирусом. Небольшая часть антител остается все же связанной с вирусом, даже после интенсивного отмывания на фильтре или в суперцентрифуге. Этот факт может обусловить частичную инактивацию вируса, как это и наблюдалось в приведенных выше опытах. В пользу такого предположения говорит возрастание <sup>процента</sup> ~~количества~~ реактивированного вируса по мере усиления интенсивности промывания.

Второй вероятной причиной, объясняющей уменьшение количества вируса в нейтральных смесях, является агрегация /агглютинация/ частиц вируса гриппа после контакта с антителами. Помимо специфической микроагрегации элементарных телец, в нейтральной смеси имеются также крупные агрегаты, обусловленные преципитацией белков мышечных легких специфическими преципитантами, образующимися при иммунизации лошадей леточным вирусом белых мышел. Таким образом, по-видимому, и задерживая

фильтруемость через мембранные фильтры ультраfiltrата нейтральных смесей по

- 15 -

сравнению с контрольными смесями вируса и нормальной сыворотки. В процессе формирования преципитатов сыворотки они увлекают за собой и частицы вируса. Совершенно ясно, что реактивация вируса нарушает гомогенность данной взвеси, снижает точность количественного учета при титровании вируса методом последовательных разведений отдельными порциями.

Правильность такого истолкования причин частичной инактивации вируса в нейтральной смеси иллюстрирует опыт. /табл. II/.

Табл. II.

Число отмы- ваний на фильт- ре.	Антисыворотка лошади для легочного вируса						Антисыворотка кролика для хориоаллантоисной жидкости					
	1/2	1/40	1/800	1/16т.	50%	% к кон- тро- лю	1/2	1/40	1/800	1/16т.	50%	% к кон- тро- лю
2	5/5	0/5	0/5	0/5	9	0,5	3/5	0/4	0/5	0/5	4	0.25
5	4/4	1/5	2/5	0/4	30	2.2	4/4	3/4	2/5	0/5	290	21
8	5/5	4/5	0/5	1/5	170	64	4/5	4/5	2/4	0/4	240	90
12	5/5	2/4	1/5	0/4	72	27	5/5	3/5	1/5	0/4	100	48

Число отмы- ваний на фильт- ре.	Нормальная кроличья сыворотка					
	1/2	1/40	1/800	1/16т.	50%	% к кон- тро- лю
2	5/5	3/5	4/4	0/5	1700	
5	3/4	5/5	3/5	1/5	1350	
8	4/4	4/4	1/5	0/5	265	
12	4/5	4/5	2/5	0/5	205	

Суспензия легких белых мышей, в разведении 1:250, соединялась с двумя противогриппозными сыворотками. Первая сыворотка была получена путем гипериммунизации лошадей легочным вирусом гриппа. Вторая сыворотка приготовлена на путем гипериммунизации

кроликов хориоаллантоисным вирусом. Титр вируснейтрализующих антител лошадиной сыворотки превосходит в 8 раз титр кроличьей сыворотки, что было учтено при изготовлении нейтральных смесей. После полуторачасового контакта при  $t = 24^{\circ}\text{C}$  обе гипернейтральные смеси реактивировались на фильтрах Эльфорта промыванием буферным раствором Рингера /рН-7,8/. Количество промывания было различно, причем на каждое про-

мывание расходовалось 5 см<sup>3</sup> жидкости. Мы видим, что по мере уси-

- 16 -

ния процесса отмыгивания антител  $\frac{1}{2}$  реактивированного вируса возрастает, достигая после 8 отмыгиваний 64-90% количества вируса в контрольной смеси /вирус с нормальной кроличьей сывороткой/. При этом, реактивация вируса оказалась менее полной в смеси с лошадиной сывороткой, нежели с кроличьей. Возможно, что причиной тому служило образование преципитата при взаимодействии белков мышечных тканей и специфических преципитатов лошадиной сыворотки. Дальнейшие промывания вируса на фильтрах не вели к уменьшению исходной активности. Наличие далеко идущей реактивации вируса из нейтральных смесей не дает оснований сомневаться в прямом взаимодействии между вирусом и специфическими антителами. Частицы вируса вполне регулярно адсорбируют эти антитела. Судя по составу комплекса, создающийся комплекс не обладает большой прочностью и может быть легко нарушен простейшими приемами.

Итак же итоги работы. Полная реактивация вирусов после взаимодействия со специфическими сыворотками представлялась прочным авторам убедительным доказательством вирулентного действия антител. <sup>Однако с этой целью</sup> была показана возможность восстановления активности вирусов гниппы, куриной чумы, герпеса и т.д. путем простого разведения нейтральных смесей в физиологическом растворе, суперцентрифугирования или адсорбции. Одна и та же смесь вируса с антителами может быть то неактивной, то снова стать инфекционной при изменении способа заражения животных, обладающих различной чувствительностью к различным способам заражения. Возможность реактивации вируса гниппы из нейтральных смесей с сыворотками решается ~~строго~~ относительно одними авторами и положительно другими.

Нами исследованы установили регулярную реактивацию вируса гниппы из нейтральных смесей, степень которой зависела от содержания антител в смеси. Наиболее точные результаты, дающие возможность количественного учета <sup>инфекции</sup> реактивации вируса, мы получили после отмыгивания вируса от антител в суперцентрифуге или на поверхности мембранных фильтров.

В настоящей работе был подвергнут анализу процесс реактивации ви-

вируса из нейтральных смесей - условий тесного взаимодействия вируса с антителами путем увеличения концентрации антител, повышения температуры и удлинения времени контакта. Количественная сторона реакции характеризуется достаточно постоянными показателями даже при подборе оптимальных условий для взаимодействия антител на вирус. Дает ре-активный эквивалентный процент свободного вируса из гипернейтральных смесей дает основание сомневаться в существовании необратимого лигаса между антителами и вирусом гриппа, поскольку  $\frac{1}{2}$  реактивированного вируса не зависит от концентрации сыворотки, времени и температуры контакта

#### Summary.

1. Реакция вируса гриппа из нейтральных и гипернейтральных смесей может быть осуществлена при помощи разнообразных методов разделения вируса от антител.

2. Методом разведения нейтральных смесей или путем катареза удается освободить вирус гриппа лишь из точно сбалансированных смесей, в которых избыток антител невелик.

3. Простым способом выделения вируса гриппа из гипернейтральных смесей является обработка смеси иглой из углерода с последующим интра назальным заражением и тем обусловленной угли, отмытой от антител.

4. Изучение точных результатов, основанные не только на разделении, но и на количественной характеристике освобожденного из нейтральных смесей вируса, обеспечит методы адсорбции в эмульсии вируса на поверхности мембранных фильтров Олфорда, а также повторное отмывание нейтральных смесей в суперцентрифуге.

Количественная сторона реакции вируса гриппа из нейтральных смесей со специфическими сыворотками не уменьшается в условиях, позволяющих интенсифицировать взаимодействие вируса с антителами. Отмытый вирус от антител на фильтрах Олфорда в суперцентрифуге, авторами излучали высокую степень реактивности после увеличения концентрации антител, повышения температуры и удлинения времени контакта. -